



# 主論文

オプシンによる実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎

第1報 ー方法論と光顕所見ー

梅津秀夫

岡山大学医学部眼科学教室

Opsin-induced Experimental Autoimmune Uveoretinitis

-Method and Light Microscopic View-

Hideo Umezu

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

## 和文要旨

不溶性抗原であるオブシンによって実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (Experimental Autoimmune Uveoretinitis : EAU) の発症を試みた。免疫方法はアジュバントとして *Bordetella pertussis* と Freund's complete adjuvant を用い、ルイスラットに対してオブシン 200~500  $\mu$ g を接種した。一部のラットには同量を追加免疫した。結果は54匹中、17匹(31%)にEAUが発症、片眼発症も多数見られた。病理組織学的には、軽症EAUでは、周辺部網膜や乳頭周囲に限局性に視細胞外節の変性と細胞浸潤を認めた。重症EAUでは視細胞外節から外顆粒層の広範な変性、消失と浸出性網膜剝離の出現、および激しい細胞浸潤を認めた。前部ぶどう膜や脈絡膜の炎症は、臨床的にも組織学的にも軽度であった。オブシンはS抗原やIRBPに比べてそのEAU誘発性が弱く、しかもオブシンによるEAUは網膜炎が主体である等の違いを認めた。



## 英文要旨

We tried experimental autoimmune uveoretinitis(EAU) induced by opsin which is unsoluble antigen. In method, Lewis rats were injected with 200~500  $\mu$ g opsin in Bordetella pertussis and Freund's complete adjuvant. Boosters were given to some rats with the same amount of opsin. As a result, EAU were induced in 31% (17 of 51 rats). Among them there were many unilateral cases. In histopathology, we found focal degeneration of photoreceptor layer and cell infiltration in peripheral retina or around optic disc in mild cases. On the other hand, we found diffuse degeneration of photoreceptor layer and outer nuclear layer, exudative retinal detachment, and heavy cell infiltration in sever EAU. The inflammation of anterior uvea and choroid was minimal clinically and histologically. Opsin was milder in immuno-genicity as compared to S-antigen or IRBP and opsin-induced EAU was retinitis dominated.

## I. 緒言

網膜の可溶性抗原であるS抗原やinterphotoreceptor retinoid-binding protein(IRBP)による実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(Experimental Autoimmune Uveoretinitis:EAU)の報告は、これまでに数多くある。一方1984年Broekhuysenら<sup>1)</sup>は、不溶性抗原であるオプシンによってもEAUが発症する事を証明した。彼らは、ルイスラットに250 $\mu$ gのオプシン(アジュバントとしてFreund's complete adjuvantとpertussis adjuvantを使用)を接種し、高率にEAUを惹起させた。しかし、オプシンによるEAU(OPSIN-EAU)の報告はその後も少なく<sup>2, 3, 4)</sup>、その理由としてオプシンが不溶性であるためにEAUが発症しにくいことが考えられる。そこで著者は、条件を変えることによってどういう条件下で最も発症率が高くなるかについて検討した。また光顕所見についてBroekhuysenの報告や、S抗原およびIRBPによるEAU(S-EAU、IRBP-EAU)と比較し、OPSIN-EAUの病理学的特徴を改めて検討した。その結果、免疫回数による発症率の差は認めなかったが、免疫量では300 $\mu$ gで最も高率に発症した。病理所見では網膜炎が主体であり、脈絡膜、前部ぶどう膜にも強い炎症を認めるS-EAU<sup>5, 6, 7)</sup>、IRBP-EAU<sup>8)</sup>とは異なっていた。この所見はBroekhuysenの報告と一致していたが、部位によって炎症時期が異なるなど彼の報告にはない所見も認めた。以上の興味ある結果を得たので報告する。



## II. 実験方法

### 1. オプシンの精製<sup>9,10)</sup>

- 1) ウシの眼球を角膜輪部より約5mmのところで全周切開し、眼杯に硝子体が残らないように注意しながら前眼部と水晶体を含めて眼杯を分離した。網膜をスパーテルにて網膜色素上皮から剝離し、網膜を採取した。
- 2) 20眼のウシ網膜に45% ショ糖溶液(pH7.0, 0.1M 磷酸緩衝液)を加え、細胞破碎機にて網膜を粉碎し懸濁液をつくり、80,000g×60min.で超遠心を行なった。
- 3) 上清に浮かんた視細胞外節を採取し、0.1M 磷酸緩衝液を加え80,000g×30min.で超遠心を行なった。
- 4) 沈渣に40% ショ糖溶液(pH7.0, 0.1M 磷酸緩衝液)を加え、80,000g×60min.で超遠心を行なった。
- 5) 3)と同様の操作を行い、視細胞外節を採取した。
- 6) 視細胞外節を、5% Ficoll溶液に2時間反応させ、視細胞外節の細胞膜を破裂させた。
- 7) 80,000g×120min.で超遠心を行ない、上清に外節円板を集めた。
- 8) 外節円板に50mM トリス酢酸緩衝液(pH7.0)を加え、80,000g×30min.で超遠心を行なった。以後、この操作を5回繰り返し、可溶成分を除去した。
- 9) 沈渣を0.25% TritonXで可溶化し、45,000g×30min.で超遠心を行った。そして不溶成分である沈渣を除去し、オプシンの可溶化液をつくった。
- 10) オプシンの可溶化液をConA-sepharoseを用いたアフィニティークロマトグラフィーにかけ、オプシンを精製した。
- 11) 精製したオプシンをSDSポリアクリドミル電気泳動で、S抗原、IRBPが含まれないことを確認した(図1)。

〈図1

### 2. 実験動物

8~10週齢のルイスラット58匹116眼(雌43匹86眼、雄15匹30眼)を使用した。このうち、対照に4匹8眼(雌2匹、雄2匹)を使用した。

### 3. オプシンの動物接種

0.1% TritonXで可溶化したオプシン100~250 $\mu$ g/0.1mlを同量の Freund's complete adjuvantで乳化した後、ルイスラットの両足蹠に接種した。又、同量のオプシンを1mlの Bordetella pertussis( $10^9$ 個/ml)に混和し、腹腔内注射を行なった。半数の27匹(雌19匹、

雄8匹)のラットに対しては、15日から50日後に1回目と同量を追加免疫した。対照実験として、オプシンを含まない0.1% TritonX、及びBordetella pertussisを同様の方法にて2匹のラット(雌1匹、雄1匹)に1回接種し、別の2匹(雌1匹、雄1匹)には、初回接種から20日目にさらに同量を接種した。免疫後10日目より細隙灯顕微鏡にて臨床的に観察を行なった。

#### 4. 病理組織学的検索

免疫後、臨床的に変化を認めたものはその翌日に、認めないものは15日から80日後に眼球を摘出した。眼球はZenker液に固定後パラフィンに包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン染色を行ない、光学顕微鏡にて観察した。一部の眼球は、2.5%グルタルアルデヒド(pH7.4, 0.1M 燐酸緩衝液で希釈)固定1時間後に水平面で半割し、一方はパラフィン包埋を行い上記の如く光顕標本を作製した。他方は、電顕標本にした。電顕標本は1%四酸化オスミウム(pH7.4, 0.1M 燐酸緩衝液で希釈)でさらに2時間固定し、エタノール系列で脱水、エポン包埋を行なった。この段階で厚切片を作製しアズールⅡにて染色、光学顕微鏡にて観察した。その後超薄切片作製、酢酸ウラニール及びクエン酸鉛の二重染色を行い電顕標本とした(電顕所見は次報にて報告予定)。そしてEAUの発症と程度は、病理組織学的に検討し、広範な炎症を認めたものを重症EAU、部分的な炎症に留まったものを軽症EAUと分類した。



### III. 結果

#### 1. 発症率

発症率は、全体では31%、対照の4匹には異常を認めなかった。重症EAUの中で6匹(2匹は1回免疫、4匹は2回免疫)は両眼発症で、残りの3匹と軽症EAUのラットはすべて片眼発症であった。免疫回数による発症率に差はなかったが、追加免疫を行なったほうが、重症EAUの発症率が高かった(表1)。免疫量による比較は、1回免疫も2回免疫も300 $\mu$ gで最も発症率が高かった(表2)。又、雌のほうが雄よりも発症率が高かった(表3)。

表1  
表2  
表3

#### 2. 臨床所見

細隙灯顕微鏡にて前房に細胞を認めたものは、重症EAU1眼、軽症EAU1眼であった。この2眼は、免疫後12日目に細胞遊出を認めたが、翌日には消退していた。残りのラットは、明かな異常を認めなかった。

#### 3. 発症までの期間

発症までの期間は、明らかな臨床所見を呈したものが少ないので正確には判定できないが、病理像から推定すると、重症EAUでは約2週間で発症、40日目には炎症細胞は消退し、慢性期に移行していたと思われる。軽症EAUでは2週間から30日と幅があるが、平均して約3週間で発症したと思われる。

#### 4. 病理所見

##### 1) 重症EAU

a) 急性期：初期(発症後2日目)では、炎症の程度が部位によって著しく異なっていた。炎症が軽い部分では、外顆粒層に浸出液が散在していた(図2)。激しい部分では、網膜下にエオジン好性の浸出液が貯留し、浸出性網膜剝離を認めた。視細胞外節や内節は消失し、網膜下と外顆粒層に著しい炎症細胞浸潤を認めた。外顆粒層の浸出液は一層著明となり、網膜血管周囲や硝子体にも細胞浸潤を認めた(図3)。前房や毛様体、周辺部脈絡膜にも軽度に多核白血球や単核球を認めた。しかし、周辺部を除いて脈絡膜の細胞浸潤は僅かであった。

図2  
図3

極期になると、変性は外顆粒層まで進み、網膜色素上皮も細胞浸潤を受け、変性しているものもあった。網膜下の炎症細胞は、乳頭周囲では単核球が主体となり(図4)、周辺部では多核白血球が主体となっていた(図5)。そして前房や脈絡膜の炎症細胞は一層少なくなった。

図4  
図5

極期を過ぎると、細胞浸潤、網膜下液が減少し、網膜下の炎症細胞もマクロファージ様

の大型単核球が主体となっており、網膜色素上皮細胞の変性が進行し、空胞化、重層化が目立ってきた(図6)。

<図6

b)慢性期：網膜の炎症細胞は消退し、広範な視細胞外節から外顆粒層の消失を認めたが、一部外顆粒層が残存しているものもあった。そして脈絡膜の萎縮を認めた(図7)。

<図7

## 2)軽症EAU

視神経乳頭周囲、もしくは周辺部網膜の視細胞が部分的に変性消失し、単核球、多核白血球の浸潤を認め、周囲の網膜血管にも細胞浸潤を認めた(図8)。又、周辺部網膜に炎症がある症例では、毛様体にも細胞浸潤を認めた(図9)。

<図8

<図9



#### IV. 考按

1984年Broekhuysenら<sup>1)</sup>は、高度に精製されたオプシンを使ってルイスラットにEAUの発症を成功させた。彼は、免疫電気泳動を用いて精製されたオプシンにS抗原やIRBPが存在しないことを証明し、免疫学的にも抗体価の測定やリンパ球増殖反応により、オプシンによってEAUが発症したことを証明した。今回著者は、彼の報告に基づいてOPSIN-EAUの発症を試み、彼の結果やS-EAU、IRBP-EAUと比較した。

発症率であるが、Broekhuysenは、250  $\mu$ gの接種で70%に重症EAU、10%に軽症EAUを発症したとしている<sup>1)</sup>。これに比べて著者は、全体で31%と低率であった。これは不溶性であるオプシンの抗原性の保持が不十分であったためと思われる。即ち、オプシンの可溶化には界面活性剤であるTritonXが必要であるが、TritonXはアジュバントとの乳化を阻害する方向に働き、従来の連結管で結んだ二本の注射器を使った方法では、完全な乳化が得にくい。それで、著者は超音波にて完全な乳化をつくったが、作製中高温になったり、超音波自体の作用によって抗原の活性が減弱したことは否めず、そのため低発症率となつて考える。次に免疫回数による比較では発症率に有意差を認めなかった。これには二つのことが考えられる。一つはOPSIN-EAUの発症には、ラットの個体差がかなり関係しており、発症しにくいものでは何度免疫しても発症しないことで、もう一つは追加免疫がかえって発症を抑制することである。つまり追加免疫は、アレルギーの減感作療法のような役目をしたのではないかと考えられる。免疫量による比較で300  $\mu$ gで発症率が最高となったことの原因として、OPSIN-EAUの発症には免疫複合体の関与、言い換えればArthus反応の関与が考えられる。なぜなら免疫複合体の形成には、抗原と抗体の割合が適比であることが必要であり<sup>1)</sup>、300  $\mu$ gの免疫量が最適であったためと考えられる。もう一つは、上記の如く活性を保った抗原量が不安定であったために起きた結果とも考えられる。いずれにしても、Broekhuysenの報告でも安定したEAUの発症には250  $\mu$ gが必要としており<sup>1)</sup>、S抗原やIRBPに比べてEAU誘発性が弱いと思われる。いずれにしても今回オプシンによってもEAUの惹起が可能なことは確認することができた。なおBroekhuysenは、雌のラットを使用していたが<sup>1,2,3)</sup>、今回の実験でも発症率は雌の方が明らかに高かった。

病理所見であるが、重症EAUでは急性期には網膜血管周囲炎、外顆粒層の浮腫に続いて、浸出性網膜剝離、網膜外層への著しい細胞浸潤と視細胞外節から外顆粒層の変性、消失を認めた。また毛様体、前房への細胞遊出も認めたが、脈絡膜は周辺部を除いて炎症は軽度



であった。慢性期になると、炎症細胞は消退し、脈絡膜も萎縮した。軽症EAUでは視神経乳頭周囲や周辺部網膜に局所的な視細胞の破壊と炎症細胞浸潤を認めた。S-EAU、IRBP-EAUと比べると、網膜炎の進展は類似している。しかし、S抗原やIRBPでは、前房への細胞遊出が著しく、フィブリンや浸出物の析出、瞳孔閉鎖、角膜浮腫など前部ぶどう膜にも激しい炎症をきたし、脈絡膜の細胞浸潤も顕著である<sup>5,6,7,8)</sup>。これに対してオプシンでは、臨床的に前房細胞が検出できた例はごく僅かであった。光顕的には、軽度前房に細胞を見るが、脈絡膜の炎症は更に軽度であった。つまりオプシンでは「激しい網膜炎のわりには、前部ぶどう膜、および脈絡膜の炎症に乏しい」という特徴を認めた。これは、Broekhuysenの「Retinitis dominated.」という表現と一致している<sup>1,2,3)</sup>。一方モルモットでは脈絡膜の炎症の方が激しいとの報告がある<sup>1,8)</sup>。これはモルモットの網膜血管があまり発達していないことによると思われる。

そのほかに著者の所見でBroekhuysenの報告と異なる点をあげると、片眼発症が多いことである。彼の報告でも、軽症EAUはすべて片眼発症であったが<sup>1)</sup>、著者の結果では重症EAUにも片眼発症を9匹中3匹に認めた。又、両眼発症の場合でも必ずしも炎症の時期は一致していない。もう一つの特徴は、部位によって炎症の時期に差があることである。例えば初期には、既に視細胞外節から外顆粒層まで変性消失している部位もあれば、外顆粒層の浮腫のみに留まっている部位もあった。極期を過ぎると、多核白血球浸潤主体の部位と、単核球浸潤主体の部位に分かれているものもあった。慢性期の標本には、一部外顆粒層が残存している部分も認めた。

今回、オプシンによってEAUを惹起させることに成功し、光顕によってOPSIN-EAUとS-EAU、IRBP-EAUに違いがあることを認めたが、次報では電顕による微細構造の検討と、何故このような違いを生じるのかについて報告する予定である。

(本論文の要旨は、第56回日本中部眼科学会にて発表した。擲筆するにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました恩師松尾信彦教授に深謝いたします。また、暖かいご指導をいただきました岡山大学医学部生化学教室の産賀敏彦教授に厚くお礼申し上げます。)



## 文献

- 1) Broekhuysen R M, Winkens H J et al.: Opsin-induced experimental autoimmune retinitis in rats. *Cur.Eye.Res.* 3: 1405-1412, 1984.
- 2) Broekhuysen R M, Kuhlmann E D et al.: Immunological and immunopathological aspects of opsin-induced uveoretinitis. *Graefe's Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 225: 45-49, 1987.
- 3) Broekhuysen R M, Winkens H J et al.: Induction of experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis by IRBP. Comparison to uveoretinitis induced by S-antigen and opsin. *Cur.Eye.Res.* 5: 231-240, 1984.
- 4) Meyers-Elliott R H, Gamman R A et al.: Experimental retinal autoimmunity(ERA) in strain B guinea pigs. Induction of ERA-retinopathy with rhodopsin. *Clin.Immunol Immunopathol.* 27:81-95, 1983.
- 5) 小山雅也: 実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)における脈絡膜循環の研究 第1報 網膜S(可溶性)抗原により惹起されたEAUの脈絡膜組織血流量. *日眼会誌* 92: 1139-1148, 1988.
- 6) 田中孝男, 高野 繁他: 網膜A抗原による実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)について. *日眼会誌* 91: 145-150, 1987.
- 7) de Kozak Y, Sakai J et al.: S antigen-induced experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Cur.Eye.Res.* 1: 327-337, 1981.
- 8) Gary I, Wiggert B et al.: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 27: 1296-1300, 1986.
- 9) Smith H J, Litman B J: Preparation of osmotically intact rod outer segment disks by Ficoll flotation. *Methods in Enzymology* 81: 57-61, 1982.
- 10) Litman B J: Purification of rhodopsin by concanavalin A affinity chromatography. *Methods in Enzymology* 81: 150-152, 1982.
- 11) 矢田純一: アレルギー. *医系免疫学*, 239-253, 中外医学社, 東京, 1989.

# 2 (主論文)

## 図の説明

図1. SDSポリアクドミル電気泳動。M:分子量マーカー 上からPhosphorylase b (97,400)、Bovine serum albumin(66,200)、Ovalbumin(42,699)、Carbonic anhydrase(31,000)、O:オブシン

図2. 重症EAU急性期初期。外顆粒層に浸出液が散在している(矢印)。(アズールⅡ染色, ×200)

図3. 重症EAU急性期初期。網膜下に浸出液をともなう激しい炎症細胞浸潤を認め、視細胞外節の破壊を認める。(H-E染色, ×200)

図4. 重症EAU急性期極期の乳頭近傍。単核球を主体とした炎症細胞を認める。(H-E染色, ×200)

図5. 重症EAU急性期極期の周辺部網膜。多核白血球を主体とした炎症細胞を認める。(H-E染色, ×200)

図6. 重症EAU急性期末期。明るい胞体を持った大型の単核球の浸潤を認め、網膜色素上皮細胞の重層化を認める(矢印)。(H-E染色, ×200)

図7. 重症EAU慢性期。視細胞外節から外顆粒層の広範な消失を認める。(H-E染色, ×200)

図8. 軽症EAUの乳頭近傍。図9. 軽症EAUの周辺部網膜。ともに部分的な視細胞外節、内節の消失と、網膜下、近傍の血管、硝子体に炎症細胞を認める。(H-E染色, ×200)



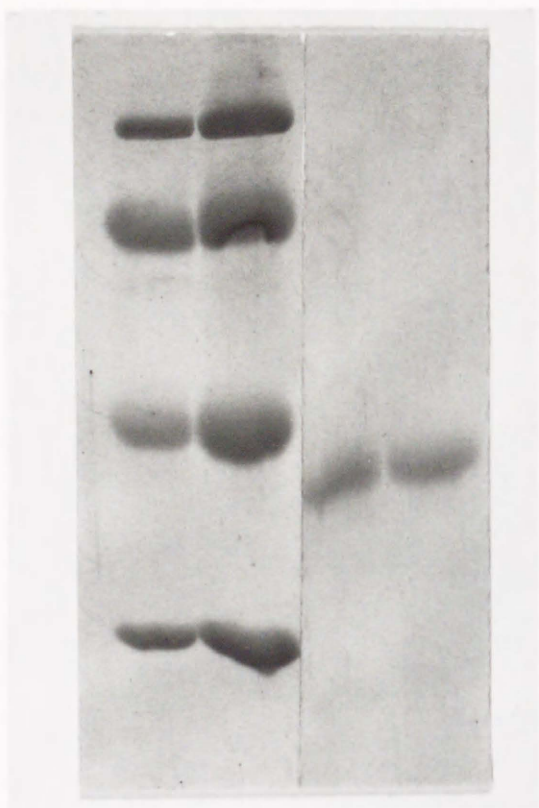


图 1

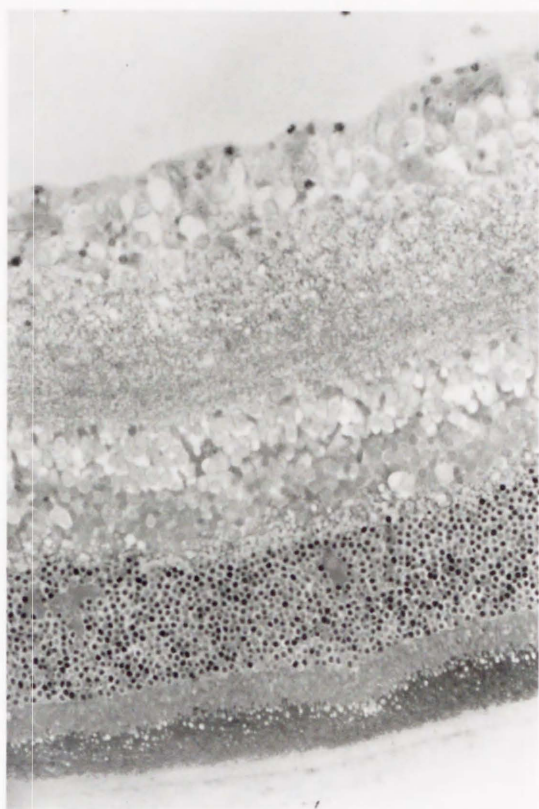


图 2.

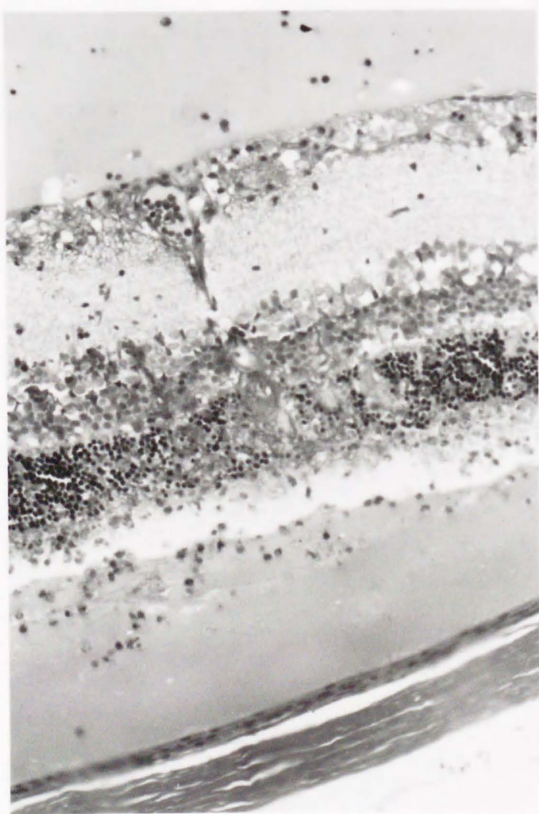


图 3

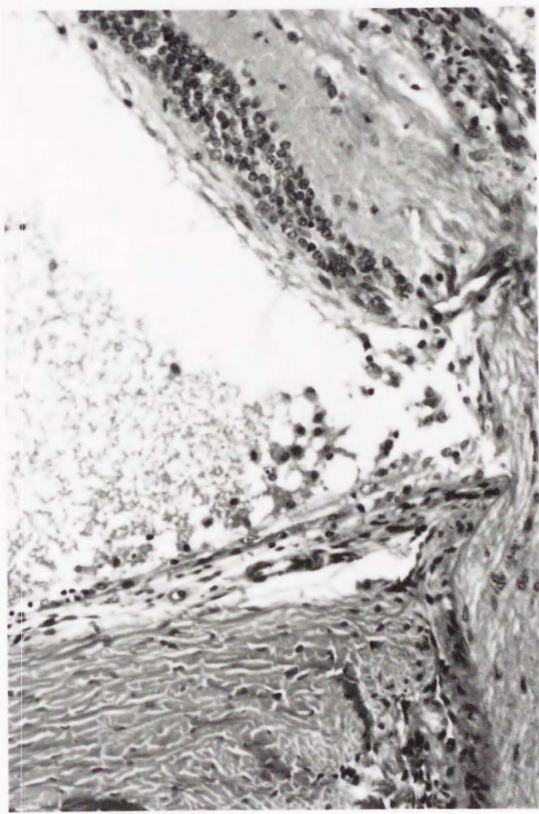


图 4.



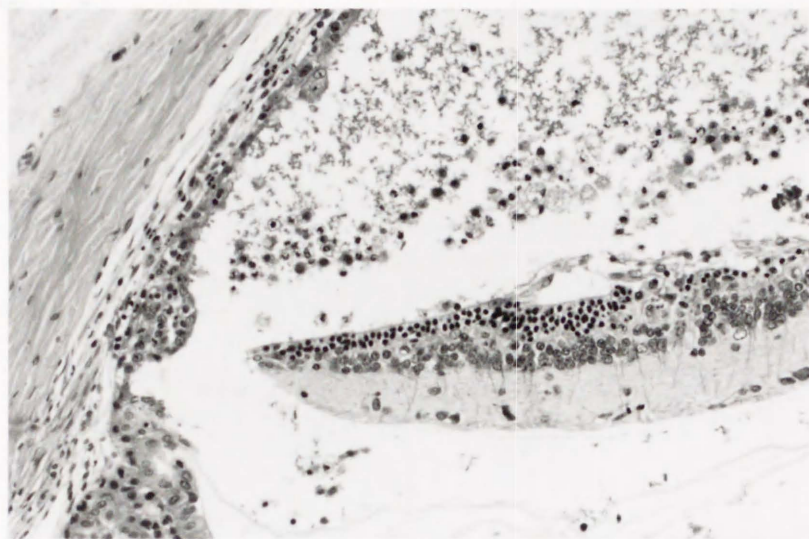


图 5

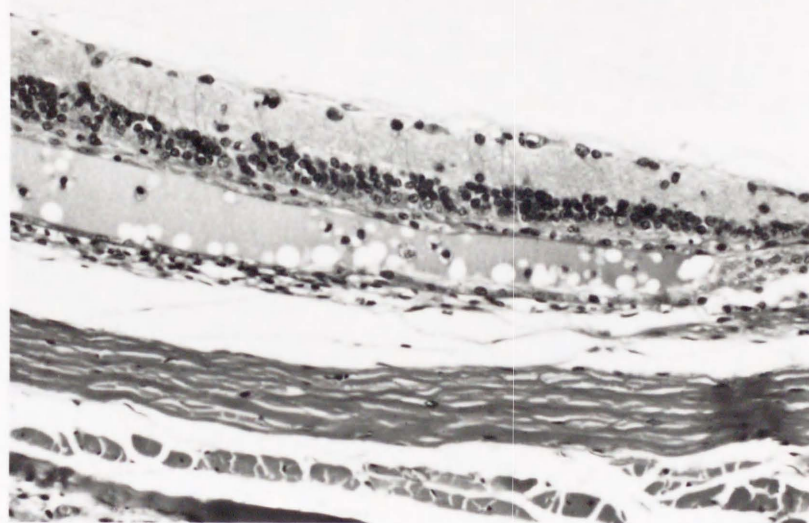


图 6



图 7



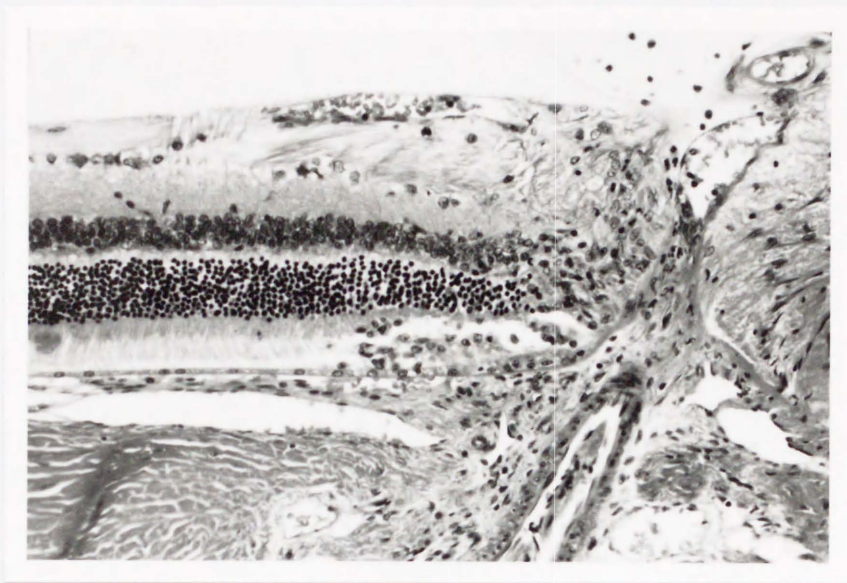


图 8



图 9

表 1. 免疫回数と発症率

	発症数 (匹)	重症 (匹)	軽症 (匹)
全 体	17/54 (31 %)	9	8
一回免疫	9/27 (33 %)	3	6
二回免疫	8/27 (30 %)	6	2

表 2. 免疫量と発症率

抗原量 (μg)	発症数 (匹)	重症 (匹)	軽症 (匹)
200	2/7 (29 %)	1	1
300	8/17 (47 %)	6	2
400	3/18 (17 %)	2	1
500	4/12 (33 %)	0	4

表 3. 性別と発症率

	発症数 (匹)	重症 (匹)	軽症 (匹)
全 体	17/54 (31 %)	9	8
雌	15/40 (38 %)	8	7
雄	2/14 (14 %)	1	1



# 主論文

オペシンによる実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎

第2報 - 電顕所見 -

梅津秀夫

岡山大学医学部眼科学教室

Opsin-induced Experimental Autoimmune Uveoretinitis

-Ultrastructural Analysis-

Hideo Umezu

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

## 和文要旨

オブシンによる実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 ( Experimental Autoimmune Uveo-retinitis:EAU)の電顕所見について検討した。その結果、網膜炎の展開は、網膜血管周囲炎に続いて、マクロファージによる網膜外層の貪食へと進み、S抗原やIRBPによるEAU(S-EAU、IRBP-EAU)と類似していた。しかし、ぶどう膜の炎症は、毛様体、周辺部脈絡膜を除いて軽度であり、S-EAU、IRBP-EAUと異なっていた。以上の病理学的特徴と低病原性よりオブシンによるEAU(OPSIN-EAU)の発症起点は、内側血液網膜関門の破綻であり、網膜色素上皮細胞の脈絡膜側表面には、オブシンの抗原が少ないことが推察された。



### 英文要旨

The morphology of opsin-induced experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) has been studied using electron microscopy. As a result, the retinitis by opsin turned out to resemble S-antigen and IRBP induced EAU (S-EAU, IRBP-EAU) as it developed from inflammation of retinal vessels to phagocytosis of retinal outer layer by macrophage. As for inflammation of uvea, however, differed from S-EAU and IRBP-EAU as it was mild except ciliary body and peripheral choroid. From these pathologic characteristics and low pathogenisity, we surmise that the starting point of opsin-induced EAU is destruction of the inner blood-retinal barrier and that the number of the choroidal surface opsin antigen on retinal pigment epithelium is few.

## I. 緒言

著者は、第1報<sup>1)</sup>において、不溶性抗原であるオプシンにおいても実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)の惹起が可能であり、その方法論と光顕所見について述べた。オプシンによるEAU(OPSIN-EAU)は、「激しい網膜炎のわりには、前部ぶどう膜、脈絡膜の炎症が軽度である」という特徴があり、これはぶどう膜全体にも激しい炎症をきたすS抗原やIRBPによるEAU(S-EAU、IRBP-EAU)とは異なっていた。過去にOPSIN-EAUの光顕像はBroekhuysenらが行なっており<sup>2,3,4)</sup>、彼らも網膜炎主体であると述べているが、現在までにOPSIN-EAUの電顕所見についての報告はない。そこで今回はOPSIN-EAUを電顕的に検討することによってその発症機構を考察し、S-EAU、IRBP-EAUと比較検討した。

その結果、網膜炎の進展はマクロファージ、好中球、リンパ球を主体としており、細胞性免疫と液性免疫の関与が考えられ、S-EAU、IRBP-EAUと基本的に類似していた<sup>5~10)</sup>。しかし、脈絡膜の炎症は光顕像と同様に軽度であった。このためOPSIN-EAUの発症起点は、内側血液網膜関門の破壊であり、網膜色素上皮細胞の脈絡膜側表面には、オプシンの抗原が少ないことが推察された。以上の興味ある知見を得たので報告する。



## II. 実験方法

### 1. オプシンの精製<sup>11,12)</sup>

- 1) ウシ網膜より視細胞外節を集めた。
  - 2) 5% Ficoll溶液を用いて外節中の円板のみを採取した。
  - 3) 外節円板を50mM トリス酢酸緩衝液(pH7.0)で、幾度も洗浄、遠沈を繰り返し、可溶成分を除去した。
  - 4) 0.25% TritonXでオプシンを可溶化した。
  - 5) ConA-sepharoseを用いたアフィニティークロマトグラフィーでオプシンを精製した。
  - 6) 電気泳動にて、S抗原、IRBPが含まれないことを確認した。
- 精製の詳細は、第1報<sup>1)</sup>に述べた。

### 2. 実験動物

8～10週齢のルイスラット18匹36眼(雌6匹、雄12匹)を使用した。この内、対照に2匹4眼(雌1匹、雄1匹)を用いた。

### 3. オプシンの動物接種

0.1% TritonXで可溶化したオプシン150～200 $\mu$ g/0.1mlを同量の Freund's complete adjuvantで乳化した後、ルイスラットの両足趾に接種した。又、同量のオプシンを1mlの Bordetella pertussis( $10^9$ 個/ml)に混和し、腹腔内注射を行なった。一部のラット(11匹)には、15～50日後に1回目と同量を追加免疫した。対照実験として、オプシンを含まない0.1% TritonX、及びBordetella pertussisを同様の方法にて2匹のラットに1回接種した。免疫後、10日目より細隙灯顕微鏡で臨床的に観察を行なった。

### 4. 病理組織学的検討

免疫後、臨床的に変化を認めたものはその翌日に、認めないものは15日から80日後に眼球を摘出した。眼球は、2.5%グルタルアルデヒド(pH7.4, 0.1M 磷酸緩衝液で希釈)固定1時間後に水平面で半割し、一方を光顕標本に、他方を電顕標本に作製した。光顕標本は、パラフィン包埋後ヘマトキシリン・エオジン染色及びマッソン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。電顕標本は、グルタルアルデヒド固定後に1%四酸化オスミウム(pH7.4, 0.1M 磷酸緩衝液で希釈)でさらに2時間固定し、その後エタノール系列で脱水、エポン包埋、超薄切片作製、酢酸ウラニール及びクエン酸鉛の二重染色を行ない透過電顕で観察した。そして、EAUの発症と程度を病理組織学的に検討し、広範な炎症を認めたものを重症EAU、

限局性の炎症に留まったものを軽症EAUと分類した。



### Ⅲ. 結果

#### 1. 発症率

発症率は、全体で31%、免疫量による発症率に有意な差を認めなかった(表1)。対象の2匹には異常を認めなかった。重症EAUのなかで2匹は両眼発症で、残りの1匹と軽症EAUのラットはすべて片眼発症であった。免疫回数でも、発症率に有意な差を認めなかった。

表 1

#### 2. 臨床所見

細隙灯顕微鏡にて重症EAUで1眼、軽症EAUで1眼に、接種後12日目に前房に細胞を認めたが翌日には消退していた。それ以外のラットには、著変を認めなかった。

#### 3. 病理所見

##### 1) 重症EAU

a) 急性期：初期(発症後2日目)では、炎症の程度が部位によって著しく異なっていた。炎症が軽い部分では、光顕上、外顆粒層に浸出液が散在していたが、他の網膜の構造は正常なように見えた。電顕では、網膜内層の血管内にリンパ球を多数認め(図1)、血管周囲にはリンパ球と好中球の浸潤を認めた(図2)。外顆粒層の細胞中、浸出液付近の細胞には核濃縮に陥っているものもあったが(図3)、視細胞外節は正常構造を保っていた(図4)。

図 1  
図 2  
図 3

炎症が激しい部分では、光顕上、浸出性網膜剝離を認め、視細胞外節や内節は消失し、網膜下と外顆粒層に著しい細胞浸潤を認めた。外顆粒層の浸出液は一層著明となり、網膜血管周囲や硝子体にも細胞浸潤を認めた。電顕では、網膜血管周囲に炎症細胞浸潤を認め(図5)、網膜下や外顆粒層の浸出液に多数のマクロファージと少数の好中球を認めた。マクロファージは視細胞外節や内節、及び視細胞の核を貪食し、外節から外顆粒層が変性崩壊していく像がみられた(図6, 7)。脈絡膜は、周辺部には好中球の浸潤を認めたが(図8)、他の部分には、あまり炎症細胞を認めなかった。網膜色素上皮細胞には大きな異常を認めなかった。

図 5  
図 6, 7  
図 8

b) 慢性期：光顕では、細胞浸潤は消退し、視細胞外節から外顆粒層の広範な消失を認め、脈絡膜は萎縮していた。電顕では、脈絡膜毛細血管に血栓形成がみられ(図9)、脈絡膜は一般に線維芽細胞が増加していた。網膜色素上皮層には新生血管がみられ(図10)、網膜色素上皮細胞の重層化を認めた。

図 9  
図 10

##### 2) 軽症EAU

周辺部網膜に局所的な視細胞外節や内節の破壊と、好中球、マクロファージとリンパ球

の浸潤を認めた(図11)。又、毛様体や周辺部の網膜血管にも炎症細胞を認めた。



#### IV. 考按

オプシンによるEAUの電顕所見をまとめると、重症EAUの急性期には、まず外顆粒層の浮腫に続いてリンパ球と好中球を主体とした網膜血管周囲炎が起こり、その後浸出性網膜剝離、マクロファージを主体とした視細胞外節の貪食、網膜外層の変性、消失へと炎症が展開した。すなわち炎症の主役を演じたのはリンパ球、好中球及びマクロファージであった。この三者の役割を考えながら網膜炎の進展を推察すると、初期に視細胞外節のオプシン抗原と循環抗体及び補体が結合し、免疫複合体を形成する。補体からの走化因子にて好中球が出現し、Arthus型の炎症反応を惹起する。同時にリンパ球は、抗体の増産とマクロファージを活性化し、その旺盛な食作用を促進する。要するにOPSIN-EAUの発症には電顕像から液性免疫と細胞性免疫の双方が関与することが推測された<sup>13)</sup>。Broekhuysenは、抗体価の測定とリンパ球増殖反応による免疫学的見地からこれを証明した<sup>2,3)</sup>。また彼は、OPSIN-EAUがシクロスポリンによって抑制されたことからT細胞が重要な役割を果たしたことを証明した<sup>4)</sup>。一方S-EAUの電顕像にても、好中球、リンパ球、マクロファージが炎症の主体をなしており<sup>5,6,7)</sup>、Arthus反応の関与<sup>8)</sup>、シクロスポリンによる抑制も報告されている<sup>9)</sup>。このように網膜炎の病理像はOPSIN-EAUもS-EAUも基本的に類似していることが確認された。しかし両者の決定的な違いは脈絡膜の炎症程度にある。S-EAUやIRBP-EAUの脈絡膜の所見は小山ら<sup>14)</sup>が報告しているが、彼は発症直後には網膜の浸潤部位に一致して脈絡膜にも局所的な炎症細胞浸潤が起こり、そして発症1～3日後には脈絡膜と網膜にはびまん性に多数のリンパ球と多核白血球の浸潤を認めたと述べている。つまり網膜と脈絡膜の炎症時期が一致しており、炎症細胞は、脈絡膜側と網膜側の双方から出現するものと推測される。これに対してOPSIN-EAUでは、毛様体には好中球とリンパ球、脈絡膜には周辺部に好中球を主体とする炎症細胞浸潤を認めたが、周辺部を除いて脈絡膜の炎症はごく僅かであった。このためOPSIN-EAUでは炎症細胞が網膜血管を経由して出現したと考えられる。もっとも網膜下に貯留する多量の浸出液は、その由来が網膜血管経由のみとは考えにくく、軽度ではあるが脈絡膜にも炎症が起こり、網膜色素上皮経由で浸出液の漏出があったと思われる。

それではOPSIN-EAUが網膜炎主体であり、脈絡膜の炎症に乏しいのは何故であろうか。これについては、S-EAU、IRBP-EAUの発症機構と比較しなければならない。S-EAUでは臼井ら<sup>15)</sup>によると、網膜色素上皮細胞(RPE)の脈絡膜側表面に存在するS抗原と血中の抗S抗体が反応し、RPEが損傷を受けることによって免疫系と外節中のS抗原が接触すると述べている。



つまり、外側血液網膜関門の破綻がEAU発症の契機となると提唱している。実際、先に述べた小山の脈絡膜と網膜の炎症段階が一致する病理像はこの説を裏付ける所見と思われる。逆にこの説から考察すると、RPEの脈絡膜側表面にはオプシンの抗原が少ないために脈絡膜の炎症が起こりにくいのではないか。これを示唆する所見としてBroekhuysenは次のような結果を残している。250  $\mu$ gのオプシンでも血管の透過性亢進作用を持つ pertussis adjuvant(以後P.A.と略す)を加えない場合、発症率が著しく低下している<sup>2)</sup>。勿論 S-EAU、IRBP-EAUでもP.A.によって炎症の程度が激しくなり、発症までの期間も短くなる<sup>4,10,16)</sup>。しかし適量の抗原さえあれば、P.A.がなくてもほぼ100%に発症が可能である。つまりOPSIN-EAUの発症にはP.A.の働きが非常に重要な因子なのである。P.A.によって血管の透過性が亢進すると、網膜血管が拡張し循環抗体が内側網膜血液関門を通過して視細胞外節に到達する。一方脈絡膜の血管も拡張するが、抗体はRPEに阻まれて外側血液網膜関門を突破できないと考えられる。ここでもしRPEの脈絡膜側表面に抗原が多数存在すれば脈絡膜にも激しい炎症が起きたであろう。要するに内側血液網膜関門の破綻がOPSIN-EAUの発症起点となり、このため網膜炎が主体になると考えられる。

ところで網膜外層の中で多く存在するタンパク質は、圧倒的にロドプシンとオプシンである。しかし各抗原の病原性の強さを比較すると、S抗原とIRBPは同程度に最も強く、次いでロドプシン、そして最も弱いのがオプシンである<sup>17,18)</sup>。どうしてこのような結果になるのだろうか。一つには、抗原に対する免疫系の反応量の差が考えられる。しかしSchalkenら<sup>17,18)</sup>は、同量のロドプシンとオプシンを接種した場合、抗体価やリンパ球増殖反応に差がないと報告しており、よってこの考えでは説明できない。そうすると前述のRPE表面の抗原量によって炎症の程度が左右されるのではないだろうか。何故なら網膜血管経由で、免疫系と抗原が接触することはP.A.などの血管透過性因子がなければ難しく、一方RPEの脈絡膜側表面の抗原となら抗体はより容易に接触できると考えられるからである。

慢性期の所見は、RPEの変性と増殖、網膜内新生血管の存在、脈絡膜毛細血管閉塞過程など網膜外層の崩壊にともなう続発性の変化であり、これもS-EAU<sup>19)</sup>と類似していた。

軽症EAUの病理像は、マクロファージによる視細胞の局所的な貪食と血管周囲炎を特徴とし、発症機構そのものは重症EAUと同じと思われる。しかし、ここで一つの疑問が生じる。何故炎症は、局所的なものに留まったのであろうか。外側であれ、内側であれ一旦血液網膜関門を突破して免疫細胞が抗原に到達したのなら、そこでは炎症起因物質が放出され、より炎症が生じやすい環境がつけられると思われ、更にそこには標的となる抗原が無限に



存在するというのに炎症は何故限局性に留まったのだろうか。その理由として、免疫寛容が働いたか、免疫系と抗原との間に新たなブロック機構があるか、それとも感作されたりリンパ球が少ないので抗体の供給不足に陥ったか等が考えられる。今後、これに関する研究が必要であろう。

OPSIN-EAUは網膜炎主体で、より病原性が弱いという特徴を持ち、S-EAU、IRBP-EAUとは異なった面を持つ。今後、OPSIN-EAUの研究の発展はEAU発症のメカニズム、ひいてはぶどう膜炎発症の解明に近づくのではと思われる。

(本論分の要旨は、第95回日本眼科学会総会にて発表した。稿を終えるにあたり、ご懇意なご指導とご校閲を賜った恩師松尾信彦教授に深謝いたします。またご協力いただいた教室の諸兄姉に感謝いたします。)

## 文献

- 1) 梅津秀夫：オプシンによる実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 第1報 方法論と光顕所見. 眼紀投稿中, 1992.
- 2) Broekhuysen R M, Winkens H J et al.: Opsin-induced experimental autoimmune retinitis in rats. *Cur.Eye.Res.* 3: 1405-1412, 1984.
- 3) Broekhuysen R M, Kuhlmann E D et al.: Immunological and immunopathological aspects of opsin-induced uveoretinitis. *Graefe's Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 225:45-49, 1987.
- 4) Broekhuysen R M, Winkens H J et al. : Induction of experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis by IRBP. Comparison to uveoretinitis induced by S-antigen and opsin. *Cur.Eye.Res.* 5: 231-240, 1986.
- 5) de Kozak Y, Thillay B et al.: Hyperacute form of experimental autoimmune uveo-retinitis in Lewis rats, electron microscopic study. *Graefe's Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 208: 135-142, 1978.
- 6) Rao N A, Brown C J et al.: Ultrastructural analysis of experimental allergic uveitis in rabbit. *Ophthalmic Res.* 18: 15-21, 1986.
- 7) Forrester J V, Borthwick G M et al.: Ultrastructural pathology of S-antigen uveoretinitis. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 26: 1281-1292, 1985.
- 8) 坂井純一: Immune complexes in experimental autoimmune uveoretinitis. *日眼会誌* 87: 1288-1299, 1983.
- 9) Nussenblatt R B, Rodrigues M M et al. : Cyclosporin A inhibition of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats. *J.Clin.Invest.* 67: 1228-1231, 1981.
- 10) Gary I, Wiggert B et al.: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 27: 1296-1300, 1986.
- 11) Smith H J, Litman B J et al. : Preparation of osmotically intact rod outer segment disks by Ficoll flotation. *Methods in Enzymology.* 81: 57-61, 1982.



- 12) Litman B J : Purification of rhodopsin by concanavalin A affinity chromatography. *Methods in Enzymology*. 81: 150-152, 1982.
- 13) 矢田純一：医系免疫学，中外医学社，東京，1989.
- 14) 小山雅也：実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）における脈絡膜循環の研究 第1報 網膜S(可溶性)抗原により惹起されたEAUの脈絡膜組織血流量。 日眼会誌 92: 1139-1148, 1988.
- 15) 臼井正彦，松島利明 他：実験的自己免疫性葡萄膜炎の発症機構における網膜色素上皮の関与について。 日眼会誌 84: 1064-1074, 1980.
- 16) de Kozak Y, Sakai J et al. : S antigen-induced experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Cur.Eye.Res.* 1: 327-337, 1981.
- 17) Schalken J J, Winkens H J et al. : Rhodopsin-induced experimental autoimmune uveoretinitis : Dose-dependent clinicopathological features. *Exp.Eye.Res.* 47, 135-145, 1988.
- 18) Schalken J J, van Vugt A H M et al. : Experimental autoimmune uveoretinitis in rats induced by rod visual pigment : rhodopsin is more pathologic than opsin. *Graefe's Arch.Ophthalmology*. 226: 255-261, 1988.
- 19) 小山雅也，松尾信彦：実験的自己免疫性ぶどう膜炎における脈絡膜組織血流量と病理組織変化－発症後長期の変化を中心として－. *Ther.Res.* 10: 129-136, 1989.

# (主論文)<sub>2</sub>

## 図の説明

図1. 重症EAU急性期初期。網膜内層の血管腔にリンパ球を認める。(bar:10 $\mu$ m)

図2. 重症EAU急性期初期。網膜内層の血管周囲に好中球とリンパ球を認める。(bar:10 $\mu$ m)

図3. 重症EAU急性期初期。外顆粒層に浸出液(☆)と核濃縮(矢印)を認める。(bar:2 $\mu$ m)

図4. 重症EAU急性期初期。視細胞外節は正常構造を保っている。(bar:2 $\mu$ m)

図5. 重症急性EAU極期。網膜内層の血管腔にリンパ球、マクロファージを認め、血管周囲に好中球、リンパ球、マクロファージの浸潤を認める。(bar:10 $\mu$ m)

図6. 重症EAU急性期極期。網膜外顆粒層に好中球と、視細胞の核を貪食したマクロファージ(矢印)を認める。(bar:20 $\mu$ m)

図7. 重症EAU急性期極期の網膜外層。視細胞外節を貪食したマクロファージを認める。  
(bar:10 $\mu$ m)

図8. 重症EAU急性期極期。周辺部脈絡膜毛細血管、および血管周囲に好中球を認める。  
b:ブルッフ膜 e:毛細血管内皮細胞の核 n:好中球 矢印:毛細血管内皮(bar:2 $\mu$ m)

図9. 重症EAU慢性期。脈絡膜毛細血管に血栓形成を認める。  
b:ブルッフ膜 (bar:2 $\mu$ m)

図10. 重症EAU慢性期。網膜色素上皮細胞層の新生血管。フェネストレーションを認める(矢印)。(bar:10 $\mu$ m)

図11. 軽症EAU。周辺部網膜。網膜下にマクロファージと好中球の浸潤を認める。  
e:外顆粒層 c:毛様体 (bar:20 $\mu$ m)



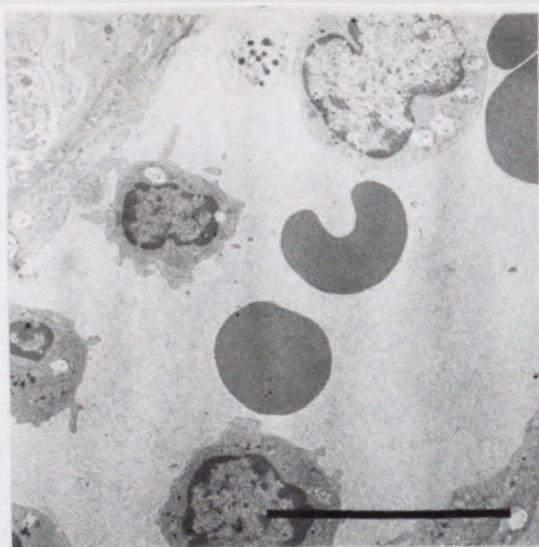


图 1

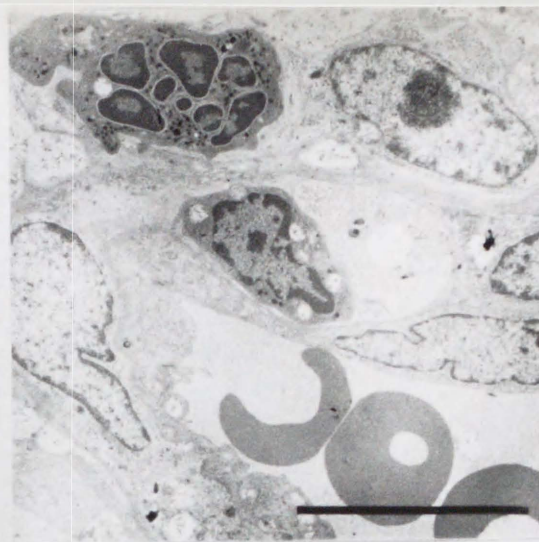


图 2

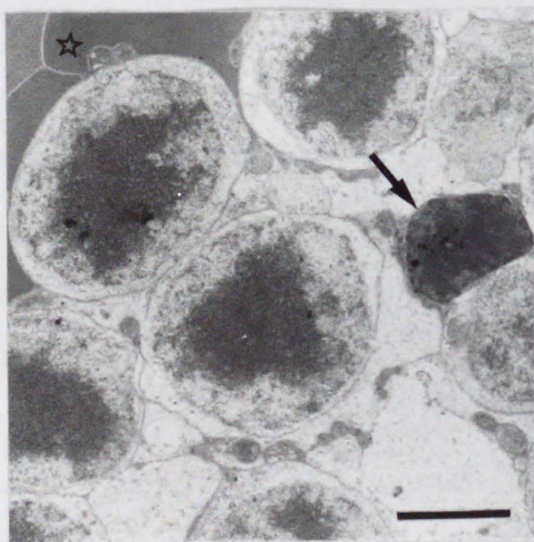


图 3

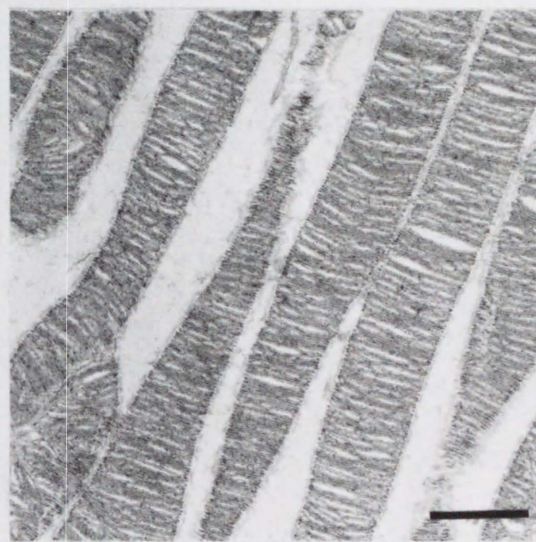


图 4

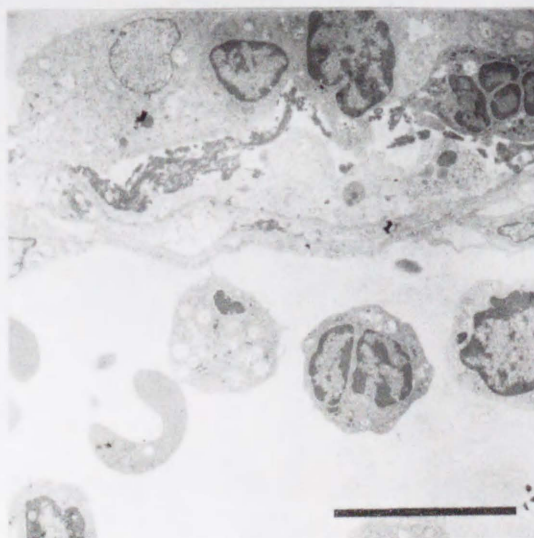


图 5

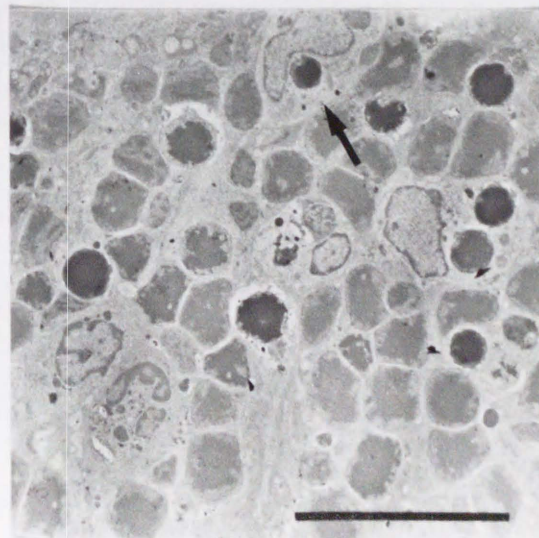


图 6



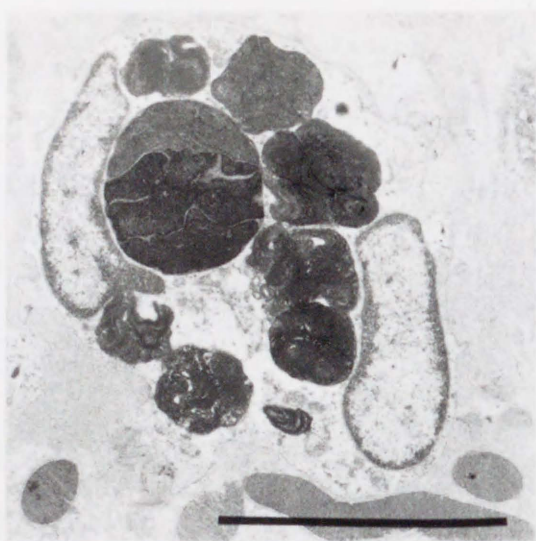


图 7

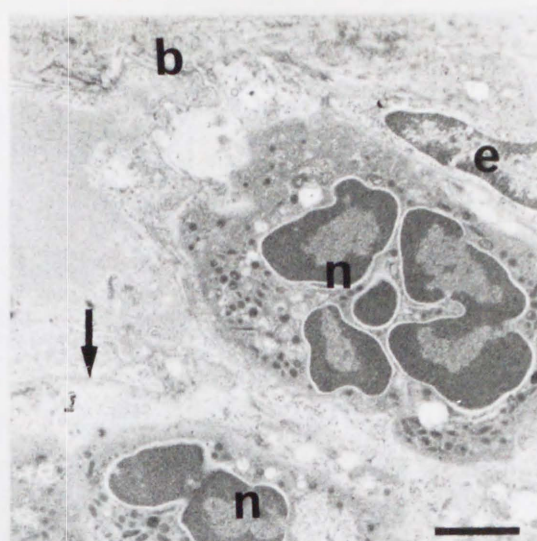


图 8

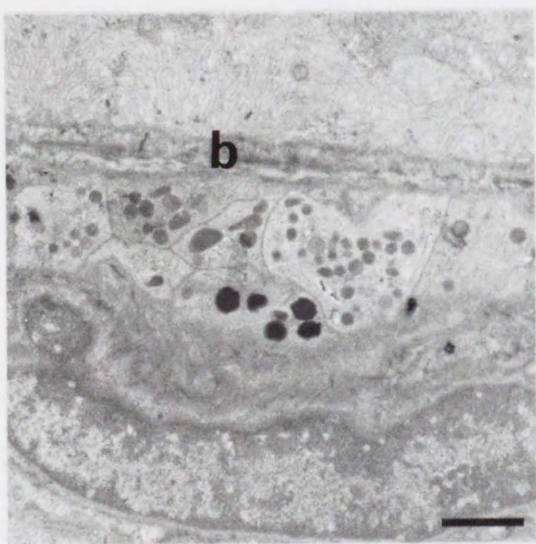


图 9

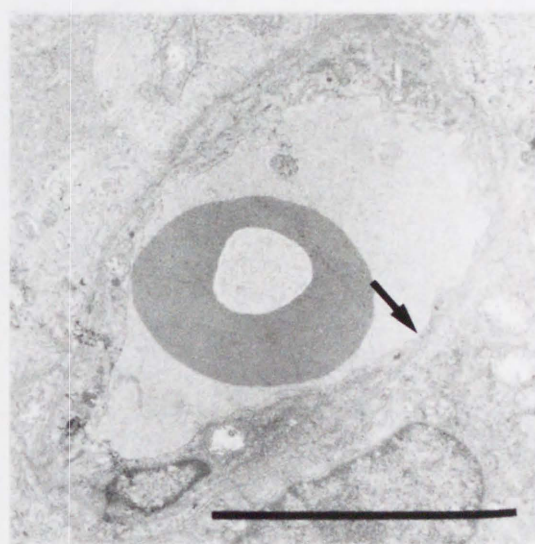


图 10

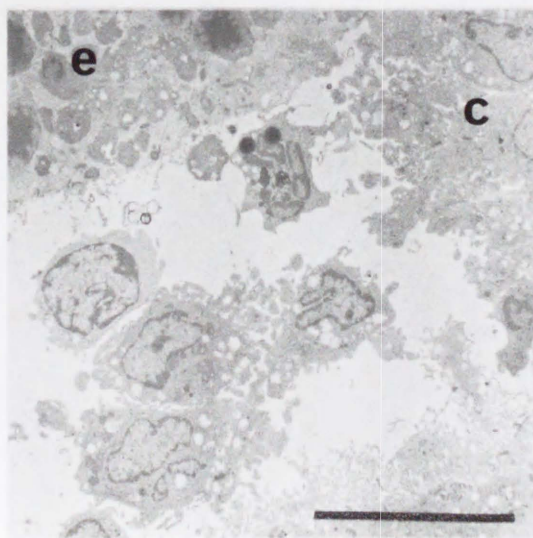


图 11



表1. 発症率

抗原量 (μg)	発症数 (匹)	重症 (匹)	軽症 (匹)
300	2/6 (33%)	1	1
400	3/10 (30%)	2	1
全 体	5/16 (31%)	3	2



